

08-03

-DNA Ligation Kit-

Ligation high

(Code No.:LGK-100)

使用说明书

科研用

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

目 录

【 注意 】

本试剂盒包含的试剂均为研究用试剂，请不要当作诊断和临床试剂使用。在本试剂盒使用过程中，请务必严格遵守实验室的各项注意事项，注意安全。

[1] 前言

DNA 片段的连接反应是在遗传基因操作实验中的常用操作。在以往的连接反应中，要根据不同的底物设置不同的条件，还要分别添加各自不同的反应组成成分，比较复杂麻烦。另外，在进行插入连接时，要得到较高的转化效率也十分困难。

因此，东洋纺公司为了解决此类问题，开发了操作简便而高效的试剂盒。本试剂盒的反应液中包括了所有连接反应所需要的试剂，适用于多种类型的连接反应。另外，本说明书介绍了使用 Ligation high 时的标准结果。

[2] 操作程序

1．使用方法

- 请将本品保存在-20℃以下环境中。
- 在冰上使 Ligation high 融解。将其放置在冰上 5-10 分钟便会自然融解。
- 配制准备连接用的 DNA 溶液。
- 取 DNA 溶液加入等量至半量的 Ligation high，混匀。
- 在 16℃下反应 30 分钟。
- 反应完成后，其反应液可以直接使用于转化。

2．进行高效连接

- 连接效率较低时，使用乙醇沉淀等提纯 DNA。
- 要控制反应液量时，可减少 DNA 液体的使用量，和相当于其半量的 Ligation high 进行混合。(参照第二页)
- 注意在活性细胞中添加大量的反应液会降低转化的效率。需要添加大量反应液时，要先用乙醇沉淀等将 DNA 进行浓缩。
- 连接效率受盐浓度的影响。要进行高效率的连接反应时，先用不含盐的TE buffer[*1]将DNA溶解后再进行连接反应。(参照第 7 页)

[*1] 10mM Tris-HCI, pH8.0/1mM EDTA

[3]　Ligation high的特征[*1]

1．优良的连接反应效率

和单独使用 T4 DNA Ligase 相比能获得 50 倍以上的效率。

2．少量液体便可进行反应

将等量到半量的 Ligation high 和 DNA 溶液混合使用。

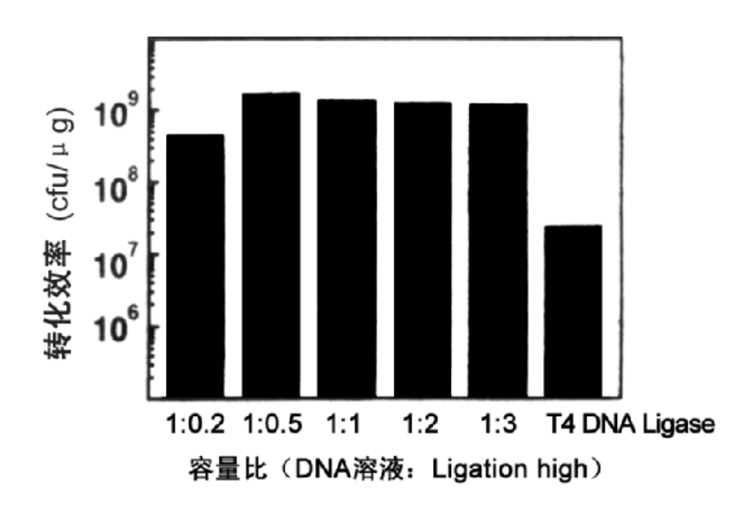


图 1 体积比的不同(DNA 溶液:Ligation high)导致的转换效率的不同

3．优良的稳定性

即使反复进行 50 次冻结和融解仍然未见连接效率下降。

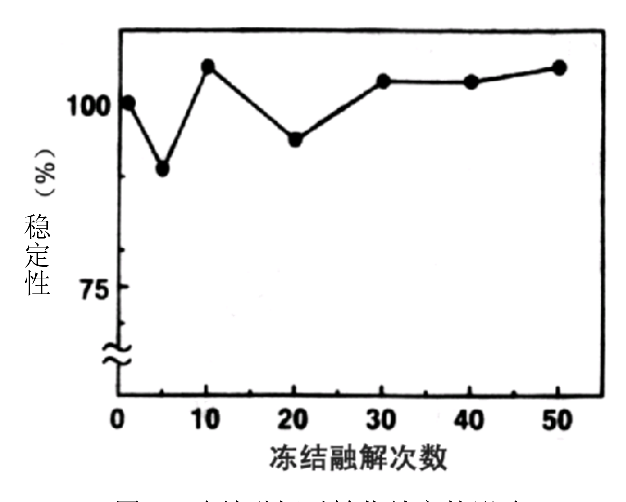


图 2　冻结融解对转化效率的影响

[*1] 本页的实验结果全部是自身连接的结果。自身连接使用和第 7 页相同(用TE buffer溶解)的方法。

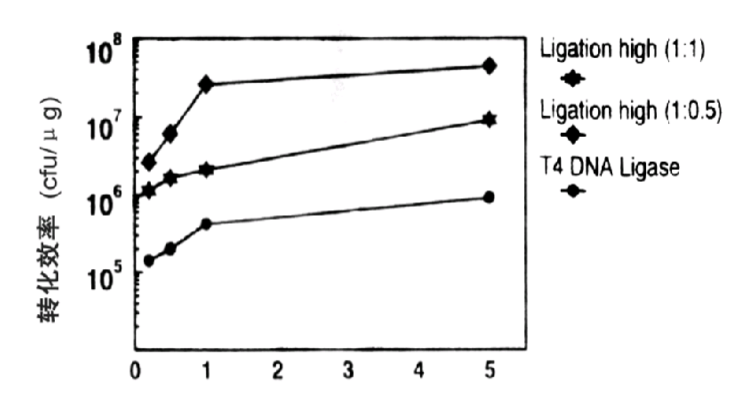
[4] 实例

1．插入连接

(1) 方法

- 配制在脱磷酸化的 pBluescriptⅡ/*Ban*III(50ng,25fmol)中加入了 pUC18/*Taq* I 的 1,444bp 片断(5～125ng,5～125fmol)的 DNA 溶液 5μl。
- 取 DNA 溶液和等量(5μl)或半量(2.5μl)的 Ligation high 混合，在 16℃条件下反应 30 分钟。
- 取*E.coli* JM109 的感受态细胞[*1]在 2μl反应液中进行转化，将其在含有X-Gal、IPTG以及氨苄青霉素的LB培养皿上培养，根据其生成的菌落数量推测转化效率。
- 使用 T4 DNA Ligase 的 16hr 反应液作对照。

(2) 结果和结论



插入物/底物的摩尔比

图 3 影响连接反应效率的插入物/底物的摩尔比

插入物/底物 (摩尔比)	Ligation high (容量比 1:1)	Ligation high (容量比 1:0.5)	T4 DNA Ligase
0.2	52	63	12
0.5	50	65	21
1.0	56	61	27
5.0	66	72	39

表 2 白色菌落的比例（%）

- 插入物/底物的摩尔比在 1.0 以上时可以得到较好的结果。

[*1] 转化效率是 1.07×10^9cfu/μg pBluescriptⅡ

2. linker 连接

(1) 方法

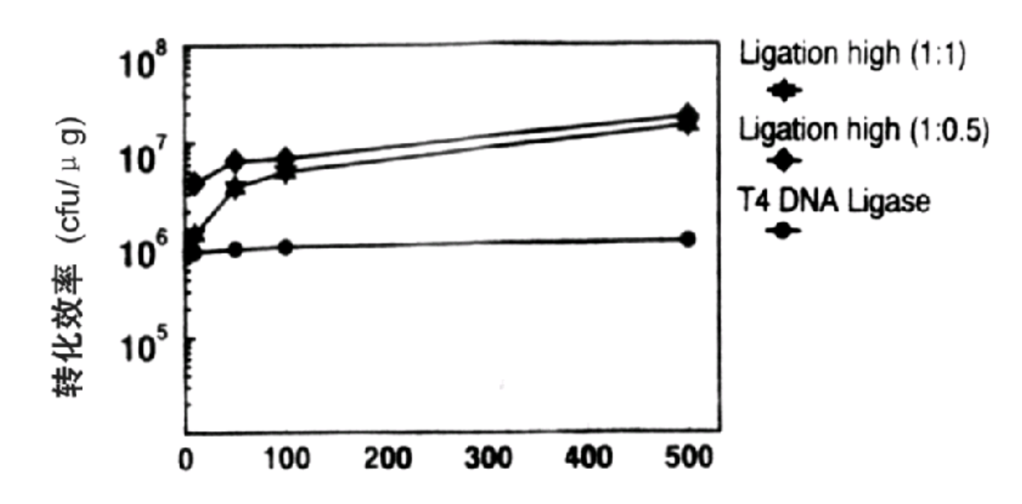
•配制 DNA 溶液在脱磷酸化的 pBluescriptⅡ/*Hinc*Ⅱ(100ng,50fmol)中加入了脱磷酸 *Eco*RⅠlinker (2.6～130ng,0.5～25pmol)的 DNA 溶液 5μl。

• 取 DNA 溶液和等量(5μl)或半量(2.5μl)的 Ligation high 混合，在 16℃条件下反应 30 分钟。

• 取*E.coli* JM109 的感受态细胞[*1]在 2μl反应液中进行转化，转化液在含有 X-Gal、IPTG以及氨苄青霉素的LB培养皿上培养，根据其生成的菌落数量推测转化效率。

• 使用 T4 DNA Ligase 的 16hr 反应液作对照。

(2) 结果和结论



插入物/底物的摩尔比

图 3 影响连接反应效率的插入物/底物的摩尔比

插入物/底物 (摩尔比)	Ligation high (容量比 1:1)	Ligation high (容量比 1:0.5)	T4 DNA Ligase
10	51	57	23
50	54	65	24
100	57	64	38
500	54	76	38

表 2 菌落的比例（%）

• 插入物/底物的摩尔比在 100 以上可以得到较好的结果。

[*1] 转化效率是 1.07×10^9cfu/μg pBluescriptⅡ

3．噬菌体连接

(1) 方法

- 配制在λZAPⅡ的 *Eco*RⅠarm(250ng)中加入 Test lnsert(200ng)的 DNA 溶液 5μl。
- 取 DNA 溶液和等量(5μl)或半量(2.5μl)的 Ligation high 混合，在 16℃或 26℃下反应 10 分钟到 1 个小时。
- 取反应液 4μl 和 GIGAPACKⅢ old 进行体内包装，并使其感染 *E.coli* XL1-Blue，测量转化效率。
- 使用 T4 DNA Ligase 的 16hr 反应液作对照。

(2) 结果和结论

表 3　噬菌体连接反应中反应条件的影响

（pfu/μg　λZAPⅡ）

反应条件	Ligation high (1:1)	Ligation high (1:0.5)	T4 DNA Ligase
16℃×10min	2.20×10^{5}	7.68×10^{6}	-
16℃×30min	5.20×10^{5}	8.32×10^{6}	-
16℃×60min	3.00×10^{6}	1.15×10^{7}	-
16℃×16hr	3.21×10^{6}	9.35×10^{6}	2.15×10^{5}
26℃×10min	4.80×10^{5}	5.12×10^{6}	-
26℃×30min	1.20×10^{6}	3.20×10^{6}	-
26℃×60min	2.00×10^{6}	3.84×10^{6}	-
26℃×16hr	1.19×10^{6}	3.56×10^{6}	3.09×10^{5}

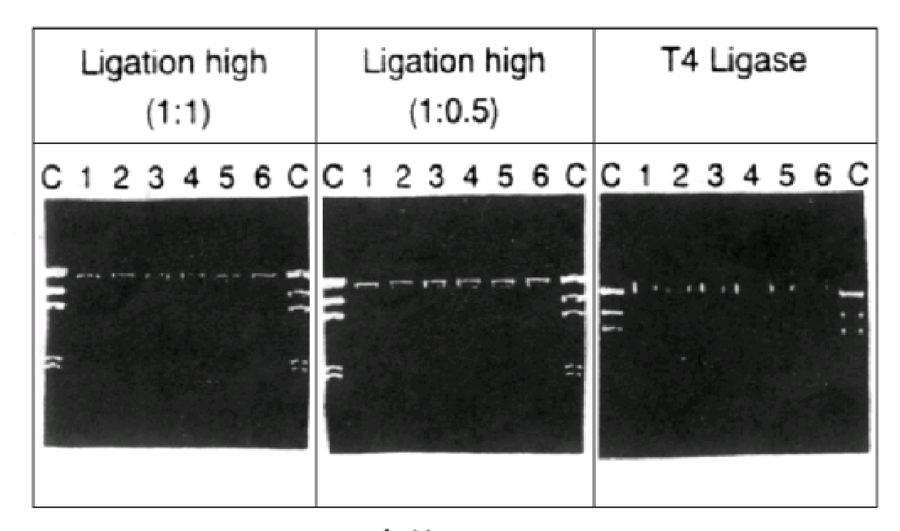
- 反应温度在 16℃到 26℃之间连接反应的效率没有显著的差别。
- 反应 30 分钟,显示可以得到充分的连接反应效率。

4．通过电泳进行确认

(1) 方法

- 取λ/*Hin*d Ⅲ的片段(500ng)5μl 和等量(5μl)或半量(2.5μl)的 Ligation high 混合，使其在 16℃下进行反应。
- 反应结束后，使用乙醇沉淀回收 DNA，在 1%的凝胶中进行电泳。
- 使用 T4 DNA Ligase 的反应液作对照。

(2) 结果和结论



C: Control（未处理）

1: 16℃ x 5min　　4: 16℃ x30min

2: 16℃ x10min　　5: 16℃ x 1hr

3: 16℃ x20min　　6: 16℃ x16hr

图 4 连接反应液的电泳条带图

- λ/*Hin*d Ⅲ反应 5 分钟即被连接。

注意：

- 受片段末端形状的影响，有时连接反应较难完成，所以在连接效率较低时，请尝试延长反应时间。
- 反应液可以当作电泳的样品，但要得到明显的电泳条带时，请先通过乙醇沉淀进行缓冲液交换。

5．盐浓度的影响

(1) 方法

• 将 pBluescriptⅡ/*Sca* Ⅰ(5ng)溶解在添加了盐(NaCI)的 TE buffer 5μl 中。

• 取 DNA 溶液和等量(5μl)或半量(2.5μl)的 Ligation high 混合，在 16℃条件下反应 30 分钟。

• 取*E.coli* JM109 的感受态细胞[*1]在 2μl反应液中进行转化，将其在氨苄青霉素的LB培养皿上培养，根据其生成的菌落数量推测转化效率。

(2) 结果和结论

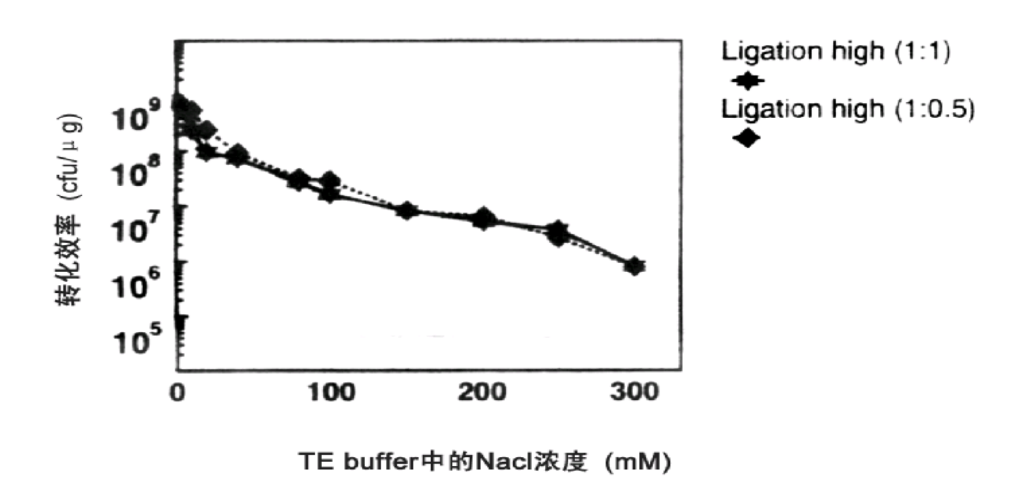


图 5 自身连接的转化效率

• 如果溶解 DNA 的 buffer 中含有盐，转化效率有可能降低。要获得较高的转化效率时，请将 DNA 溶解在不含有盐的 TE buffer 中。

[*1] 转化效率是 1.17×10^9cfu/μg pBluescriptⅡ

[5] 相关产品一览表

产品名	Code No.
T4 DNA Ligase	LGA-101
λ/*Hin*dIII digest	DNA-010
Competent high *E.coli* JM109	DNA-900
*Eco*R I Linker:d(pGGAATTCC)	ECO-801
pUC18 DNA	PUC-018

[制造 • 销售商]

东洋纺（上海）生物科技有限公司

上海市浦东新区张杨路 188 号汤臣商务中心 C 座 310 室

邮编：200122

交货期限 • 订货相关咨询

Tel:021-5879-4900　　Fax:021-5879-4901

E-Mail:sales@bio-toyobo.cn

产品内容 • 技术相关咨询

Tel:021-5879-4142　　Fax:021-5879-5259

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

http://www.bio-toyobo.cn

代理商资料：